

**XP-002253881**

**AN - 1993-340452 [43]**

**AP - JP19920360957 19921229**

**CPY - NIRA**

**DC - B04 D16 S03**

**DR - 1841-S 1848-S**

**FS - CPI;EPI**

**IC - C12N11/08 ; G01N33/53 ; G01N33/545 ; G01N33/569**

**MC - B04-B02B1 B04-B04A B04-B04C6 B11-C07A B12-K04 D05-A01A2 D05-H09  
D05-H10 D05-H11**

**- S03-E14H4**

**M1 - [01] M423 M750 M903 N102 Q233 V500 V540 V791 V802 V810**

**- [03] H7 H713 H721 J011 J271 M210 M211 M212 M232 M262 M272 M281 M320  
M423 M510 M520 M530 M540 M903 N102 P831 Q233 V600 V611 V743**

**M6 - [02] M903 P831 Q233 R515 R521 R614 R621 R625 R627 R631 R632 R635 R639**

**PA - (NIRA ) UNITIKA LTD**

**PN - JP5249116 A 19930928 DW199343 G01N33/545 009pp**

**PR - JP19920019562 19920107; JP19920019560 19920107; JP19920019561 19920107**

**XA - C1993-151327**

**XIC - C12N-011/08 ; G01N-033/53 ; G01N-033/545 ; G01N-033/569**

**XP - N1993-262693**

**AB - J05249116 An antibody-fixed high polymer material comprises fixing  
antibody to pathogenic factor to the surface of high polymer material  
by covalent bond.**

**- Also claimed is method for rapid diagnosis of infectious disease which  
comprises detecting pathogenic factor by antigen-antibody reaction by  
using the antibody-fixed high polymer material, colouring surface of  
the high polymer material by using a cpd. forming insoluble product  
after the enzymatic reaction of labelling enzyme and substrate, and  
detecting directly pathogenic factor by naked eyes.**

**- Antibody is bound via acid anhydride group to the surface of high  
polymer material by covalent bond. Pathogenic factor is e.g. tubercle  
bacillus, staphylococcus or streptococcus. High polymer material is  
e.g. ethylene-vinyl acetate copolymer, polyvinyl, chloride or  
polyurethane. For fixing pathogen factor to the surface of high  
polymer material by covalent bond, reactive functional group such as  
carboxyl, formyl or amino present on the surface of high polymer is  
utilised. The detection of pathogenic factor caught by the  
antibody-fixed high polymer material is carried out by e.g. sandwich  
method.**

**- USE/ADVANTAGE - The antibody-fixed high polymer material is used in  
clinical examination, food examination, etc. Pathogenic factor in a  
sample can be simply and rapidly detected without requiring special  
analysers.**

**- In an example, the detection of cholera enterotoxin (sic) was carried  
out by using the antibody-fixed high polymer material. (Dwg.0/0)**

**IW - ANTIBODY FIX HIGH POLYMER MATERIAL DETECT INFECT DISEASE COMPRISE FIX  
ANTIBODY PATHOGEN FACTOR FIX SURFACE POLYMER MATERIAL COVALENT BOND  
COLOUR PRODUCT DETECT**

**IKW - ANTIBODY FIX HIGH POLYMER MATERIAL DETECT INFECT DISEASE COMPRISE FIX  
ANTIBODY PATHOGEN FACTOR FIX SURFACE POLYMER MATERIAL COVALENT BOND**

**NC - 001**

**OPD - 1992-01-07**

**ORD - 1993-09-28**

**PAW - (NIRA ) UNITIKA LTD**

**TI - Antibody-fixed high polymer material for detecting infectious disease  
- comprises fixing antibody to pathogenic factor then fixing to  
surface of polymer material by covalent bond, colouring the prod. and  
detecting**

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-249116

(43)公開日 平成5年(1993)9月28日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/545	A	9015-2 J		
33/53	D	8310-2 J		
33/569	F	9015-2 J		
// C 1 2 N 11/08	Z			

審査請求 未請求 請求項の数3(全 9 頁)

(21)出願番号	特願平4-360957	(71)出願人	000004503 ユニチカ株式会社 兵庫県尼崎市東本町1丁目50番地
(22)出願日	平成4年(1992)12月29日	(72)発明者	本田 武司 大阪府茨木市西中条町3-29
(31)優先権主張番号	特願平4-19560	(72)発明者	藪下 安紀 京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内
(32)優先日	平4(1992)1月7日	(72)発明者	小池 紀夫 京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内
(33)優先権主張国	日本 (J P)		
(31)優先権主張番号	特願平4-19561		
(32)優先日	平4(1992)1月7日		
(33)優先権主張国	日本 (J P)		
(31)優先権主張番号	特願平4-19562		
(32)優先日	平4(1992)1月7日		
(33)優先権主張国	日本 (J P)		

(54)【発明の名称】 抗体固定化高分子材料及びそれを用いた感染症迅速診断法

(57)【要約】

【構成】 高分子材料表面に、病原因子に対する抗体が共有結合によって固定化された抗体固定化高分子材料、および上記の抗体固定化高分子材料を用いて病原因子を抗原抗体反応により検出するに際し、標識酵素の基質に酵素反応後、不溶性生成物を生ずる化合物を用いることにより高分子材料表面上で発色させ、直接肉眼で病原因子を検出することを特徴とする感染症迅速診断法。

【効果】 感染症の原因とされる病原因子に対する抗体を固定化した高分子材料を用いることにより、特別な分析装置を必要とせず、検体中の病原因子を極めて迅速・簡便に検出することが可能である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 高分子材料表面に、病原因子に対する抗体が共有結合によって固定化された抗体固定化高分子材料。

【請求項2】 抗体が酸無水物基を介して共有結合によって固定化された請求項1記載の抗体固定化高分子材料。

【請求項3】 請求項1記載の抗体固定化高分子材料を用いて病原因子を抗原抗体反応により検出するに際し、標識酵素の基質に酵素反応後、不溶性生成物を生ずる化合物を用いることにより高分子材料表面上で発色させ、直接肉眼で病原因子を検出することを特徴とする感染症迅速診断法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、臨床検査、食品検査等の分野で利用される抗体固定化高分子材料及びそれを用いた感染症迅速診断法に関し、詳しくは高分子材料表面で病原因子を特別な分析装置を必要とせず、極めて迅速に直接肉眼により検出できる抗体固定化高分子材料及びそれを用いた感染症迅速診断法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 病原因子の正しい診断、治療に際してはその原因となる病原因子の検査が正確にかつ迅速に行われる必要がある。病原因子が微生物である場合、一般的に行われている培養検査法では検査に熟練を要する上、10~16時間の増菌培養、18~24時間の分離培養が必要で検査成績が判明するためには長時間を要し、臨床医の治療に際する要求に必ずしも応えられていないのが現状で、病原因子の検査においては臨床で適確に役立つ検査法の開発が望まれている。

【0003】 これらの問題を解決する手段として最近、DNAプローブ法や免疫学的方法が開発され研究が進められているが、このうち免疫学的方法は抗原-抗体反応を利用するため、特異性、迅速性、簡便性などの点で優れ、しかも直接検体を検索でき、極めて迅速に診断が可能となり得るものとして期待される。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 近年、これら免疫学的手法を用いた病原因子の検出方法は盛んに研究されてきており、その一つにラテックス粒子に毒素に対する抗体を非特異的に吸着させ抗原抗体反応に伴うラテックスの凝集反応を調べる方法（ラテックス凝集法）があるが、感度が比較的低く検査時間がかかり、判定が難しく安定した結果が得られにくい等、取り扱いに関する問題点も有していた。

【0005】 また、現在多く用いられてきている方法に、病原因子に対する抗体をタンパク質と高分子材料との間の疎水的相互作用により物理的に吸着させる方法があり、その代表的なものとしてポリスチレンからなるマ

イクロタイタープレートやポリスチレン、アガロース、ガラスなどのビーズを用いて、これと検体を反応させた後酵素標識抗体を加え、プレートやビーズに回収された酵素活性を測定する方法がある。この時、反応液中の基質が分解して生ずる生成物が近紫外(190~400nm)または可視(400~800nm)領域における吸収をもつかあるいは蛍光物質を生ずるとき分光機器を用いて検出測定を行っている。しかし、一般的にこのような物理的な固定化方法により検出する場合、タンパク質と高分子材料との間の非特異的な疎水的相互作用により結合しているため、分析操作時に結合させた抗体が脱離したり、再現性が悪い等の問題点があり、また酵素反応により生じた反応液中の基質分解生成物を検出するには高価な分光機器などが必要になりコスト、簡便性、迅速性などの問題点があり、必ずしも多くの検査施設に普及しにくい面があった。

【0006】 本発明は、感染症病原因子に対する抗体を共有結合で固定化した高分子材料を用いて検体中の病原因子を特別な分析装置を必要とせず、極めて迅速に直接肉眼により容易に検出できることが可能となる抗体固定化高分子材料及びそれを用いた感染症迅速診断法を提供することを目的とするものである。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記のごとき問題点を解決するために鋭意検討した結果、病原因子に対する抗体を共有結合で固定化した高分子材料により検体中の病原因子を捕捉した後、酵素標識抗体と結合させ、この高分子材料を不溶性の生成物を生ずる標識酵素の基質溶液に作用させることにより高分子材料表面に不溶性の基質分解生成物が沈着し肉眼で高分子材料表面に存在する病原因子を検出できることを見出し本発明に到達した。

【0008】 すなわち、本発明は、高分子材料表面に、病原因子に対する抗体が共有結合によって固定化された抗体固定化高分子材料、および上記の抗体固定化高分子材料を用いて病原因子を抗原抗体反応により検出するに際し、標識酵素の基質に酵素反応後、不溶性生成物を生ずる化合物を用いることにより高分子材料表面上で発色させ、直接肉眼で病原因子を検出することを特徴とする感染症迅速診断法を要旨とするものである。

【0009】 以下、本発明を詳細に説明する。本発明における病原因子とは病気の原因物質であり、例えば結核菌、ブドウ球菌、レンサ球菌、淋菌、梅毒菌、百日咳菌、破傷風菌、大腸菌、肺炎球菌、緑膿菌、赤痢菌、ジフテリア菌、腸チフス菌、パラチフス菌、セレウス菌、エルシニア菌、カンピロバクター、ウエルシュ菌、ディフィシル菌、サルモネラ菌、腸炎ビブリオ、コレラ菌等の細菌、真菌、肺炎ウイルス、エイズウイルス、ロタウイルス、クラミジアウイルス、ヘルペスウイルス、RSウイルス、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス等のウイルスなどの病原微生物、およびボツリヌス菌の産生

するボツリヌス毒素、ブドウ球菌のエンテロトキシン、TSS毒素、腸炎ビブリオの溶血毒、コレラ菌のコレラエンテロトキシン、赤痢菌の志賀毒素、毒素原性大腸菌のエンテロトキシン、ジフテリア菌のジフテリア毒素、破傷風菌の破傷風毒素、百日咳菌の百日咳毒素、ディフィシル菌のトキシンA、緑膿菌のエクソトキシンA、ウエルシュ菌のホスホリパーゼC ( $\alpha$ -毒素) やエンテロトキシンなどの微生物が産生する毒素や定着因子などがあげられる。

【0010】上記記載の病原因子のうち、コレラ毒素としてはコレラ菌(*Vibrio cholerae*)の病原因子として知られているコレラエンテロトキシン(CT, 分子量約35,000)が挙げられる(岩永正明: 医学細菌学 3巻, p. 243-269, 1988)。

【0011】また、腸炎ビブリオ毒素としては腸炎ビブリオ(*Vibrio parahaemolyticus*)の病原因子として知られている耐熱性溶血毒(Thermostable Direct Hemolysin; TDH, 分子量約46,000)およびTDHに類似する毒素(TDH related hemolysin; TRH, 分子量約48,000)が挙げられる(三輪谷俊夫, 大橋誠(監修), 竹田美文, 工藤泰雄, 篠田純男, 本田武司(編集): 腸炎ビブリオ第III集, 近代出版)。

【0012】毒素原性大腸菌の定着因子としては腸管病原性をもつ大腸菌のうち、菌が小腸内で定着・増殖し、生産された毒素の作用により下痢を起こす毒素原性大腸菌(Enterotoxigenic *Escherichia coli*)の線毛にあたるヒト腸管細胞に付着し増殖させる因子が挙げられ(本田武司: 医学細菌学 2巻, p. 65-95, 1987)、毒素原性大腸菌の産生する毒素としては、60℃, 10分間の加熱によって失活する易熱性エンテロトキシン(heat-labile enterotoxin [LT])と100℃, 30分間の加熱でも活性を保持する耐熱性エンテロトキシン(heat-stable enterotoxin [ST])が挙げられる(本田武司, 飯田哲也: 微生物 3巻, p. 248-257, 1987)。

【0013】ボツリヌス毒素としてはボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)の産生する分子量約30万の神経毒素A, B, C, D, E, F型が挙げられる(小原恵二: 医学細菌学 1巻, p. 211-247, 1987)。

【0014】ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)の産生するエンテロトキシンとしては分子量約29,000の毒素タンパクが挙げられる(益田昭吾: 医学細菌学 4巻, p. 119-138, 1989)。

【0015】ウエルシュ菌(*Clostridium perfringens*)の産生するエンテロトキシンとしては分子量約35,000の毒素タンパクが挙げられ、ホスホリパーゼC ( $\alpha$ -毒素)としては分子量約43,000のタンパクが挙げられる(櫻井純一: 医学細菌学 4巻, p. 315-364, 1987)。

【0016】ジフテリア毒素としてはジフテリア菌(*Corynebacterium diphtheriae*)の産生する分子量約58,000の毒素タンパクが挙げられる(目加田英輔: 医学細菌学

4巻, p. 39-57, 1989)。

【0017】百日咳毒素としては百日咳菌(*Bordetella pertussis*)の産生する分子量約11万の毒素タンパクが挙げられる(佐藤勇治: 医学細菌学 1巻, p. 57-79, 1986)。

【0018】赤痢菌の志賀毒素としては赤痢菌(*Shigella dysenteriae* 1)の産生する分子量約29,000の細胞毒素が挙げられる(野田公俊: 医学細菌学 1巻, p. 281-300, 1986)。

【0019】緑膿菌のエクソトキシンAとしては緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)の産生する分子量約66,000の細胞毒性タンパクが挙げられる(松本頼樹: 医学細菌学 1巻, p. 367-436, 1986)。

【0020】ディフィシル菌のトキシンAとしてはディフィシル菌(*Clostridium difficile*)の産生する分子量約44~60万の巨大タンパクが挙げられる(中村信一: 医学細菌学 5巻, p. 55-97, 1990)。

【0021】破傷風菌の破傷風毒素としては破傷風菌(*Clostridium tetani*)の産生する分子量約15万の神経毒素タンパクが挙げられる(松田守弘: 医学細菌学 3巻, p. 307-358, 1988)。

【0022】次に、本発明に用いる病原因子に対する抗体を固定化する高分子材料としては、例えばエチレン-酢酸ビニル共重合体、ポリ塩化ビニル、ポリウレタン、ポリエチレン、ポリエステル、ナイロン、ポリスチレンなどの合成高分子、デンプン、グルテン、キチン、セルロース、天然ゴムなどの天然高分子及びそれらの誘導体が挙げられる。また、疎水基を持ったアガロース誘導体、ニトロセルロースや、それらの誘導体なども挙げられる。その他、多孔性ガラス、シリカゲル、ヒドロキシアパタイトなどの無機高分子化合物も利用可能である。

【0023】本発明において高分子材料表面に抗体を固定化するためには共有結合で固定化すればよい。共有結合法による抗体の固定化方法としては高分子材料表面に存在するカルボキシル基、ホルミル基、アミノ基、アジド基、イソシアネート基、クロロホルミル基、酸無水物基、エポキシ基等の反応性官能基を介して抗体を固定化する方法が挙げられる。反応性官能基が高分子材料表面に無い場合には材料表面にこれらの官能基を導入して固定化する方法が挙げられる。

【0024】高分子材料表面に反応性官能基を導入する方法としては、例えばエチレン-酢酸ビニル共重合体にカルボキシル基を導入する場合は、エチレン-酢酸ビニル共重合体をケン化した後、カルボキシメチル化することにより導入される。また、カルボキシル基はヒドラシル基を経てアジド基に誘導することができる。さらに、カルボキシル基は塩化チオニル、塩化アセチルなどでクロル化することによりクロロホルミル基に変えることもできる。また、エチレン-酢酸ビニル共重合体にアミノ基を導入するには、ケン化したエチレン-酢酸ビニル共

重合体をアミノアセター化すればよい。エポキシ基を導入するには、エピクロルヒドリン、ジエチレングリコールジグリシジルエーテルなどを反応させることにより導入できる。イソシアネート基はヘキサメチレンジイソシアナート、トリレンジイソシアナートなどと反応させることにより導入できる。ホルミル基はグルタルアルデヒド、ジアルデヒドデンプンなどと反応させることにより導入できる。酸無水物基はスチレン-無水マレイン酸共重合体、エチレン-無水マレイン酸共重合体、メチルビニルエーテル-無水マレイン酸共重合体などと反応させることにより導入できる他、例えばポリウレタンに無水マレイン酸を $\gamma$ 線や電子線によりグラフト重合させ酸無水物基を導入することもできる。また、高分子材料表面の反応性官能基と抗体の有するアミノ基、カルボキシル基、チオール基などとの間の共有結合により固定化することができる。さらに、酸無水物基を介して抗体を高分子材料に固定化する場合、高分子表面に存在する酸無水物基と抗体を結合してもよいし、高分子材料表面に存在する他の反応性官能基に酸無水物基を上記方法により導入し、この酸無水物基を介して化学的に抗体を固定化することもできる。

【0025】固定化処理を行う際、例えば抗体溶液を用いて処理できるが、この時使用する抗体溶液としては、抗体を好ましくは水あるいは生理食塩水に、好ましくは10~1000倍の濃度に希釈した溶液を用いることができる。抗体溶液中には必要に応じて抗菌剤、安定化剤などを含んでいても良く、また抗体溶液で処理を行うに際しての温度、時間の条件は、好ましくは常温以下の温度で、好ましくは1時間以上である。

【0026】本発明における感染症の病原因子に対する抗体は、例えばモノクローナル抗体の場合は、精製した病原因子すなわち毒素や菌体等を用いて免疫したマウスの脾細胞とミエローマ細胞との融合細胞のクローンを用いてマウス腹水を誘導したものを用いる。またポリクローナル抗体は毒素や菌体等の抗原を用いてウサギ、ヤギ、ラット、ヒツジ、ニワトリ、ブタ、ロバ、モルモット、イヌ、ウシなどを免疫して得られる血清より精製したものを用いる。

【0027】本発明は病原因子に対する抗体を固定化した高分子材料を用いて抗原すなわち病原因子を直接捕捉するが、その検出法として例えばサンドイッチ法を用いる。これは高分子材料に固定化した抗体とは別種の動物で調製した抗体を、毒素を捕捉した高分子材料と反応させ、次いで酵素などを標識した抗体を反応させる方法である。検出に用いられる酵素としてはペルオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、カルボニックアンヒドラーゼ、アセチルコリンエステラーゼなどが挙げられる。一方、酵素以外に検出に用いられる標識体として金コロイド粒子、銀コロイド

粒子などが挙げられる。また、アビジン-ビオチンを用いたり、抗体結合性を持つプロテインA、プロテインGやレクチンを介して標識体を導入させる方法なども用いられる。

【0028】本発明に用いる不溶性生成物を生ずる酵素の基質については、例えば標識酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には4-クロロ-1-ナフトールや3, 3'-ジアミノベンジジン、 $p$ -フェニレンジアミン塩酸とピロカテコールからなるHanker-Yates (HY) 試薬、3-アミノ-9-エチルカルバゾール、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンなどの基質が用いられ、アルカリフォスファターゼを使用する場合にはニトロブルーテトラゾリウムや $\beta$ -ナフチルリン酸と5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸や $m$ -フェナジメトサルフェートなどを混合した基質などが用いられる。グルコースオキシダーゼを使用する場合にはニトロブルーテトラゾリウムと $m$ -フェナジメトサルフェートを混合した基質などが用いられる。

【0029】病原因子に対する抗体を固定化した高分子材料を用いて病原因子を検出するには、まず抗原である病原因子と反応させる前に、材料表面の非特異的に抗体などと結合する部分を抗血清や非干渉性のタンパク質でブロックする操作（ブロッキング）が必要である。ブロッキングに使用されるタンパク質としてはウシ血清アルブミン (BSA)、オボアルブミン、ヘモグロビン、ゼラチンなどが挙げられる。ブロッキングするには、これらタンパク質を0.9%塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液 (pH7.2) あるいはリン酸緩衝液 (pH7.2) に溶解して、37℃、1.5時間または4℃、一晩材料と反応させればよい。反応後は材料を0.05%ポリエチレンソルビタンモノラウレート (0.05%Tween20)、0.9%塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液またはリン酸緩衝液にて2~6回洗浄する。

【0030】本発明に用いる検体としては、下痢便、痰、体液等のヒト患者材料を直接用いるか、患者材料より分離した菌体の培養上清を用いればよい。患者材料を直接検体とする場合は、例えば検体を0.05%ポリエチレンソルビタンモノラウレート、0.9%塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液で2~50倍に希釈して用いる。一方、患者材料より分離した菌体の培養上清を用いる場合、例として腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* を挙げると、患者材料より分離された菌株を、ヘプトン-食塩増地 (1%ポリヘプトン (Difco社製)、3%塩化ナトリウム、0.5%リン酸水素二ナトリウム) あるいはSPP増地 (1%ポリペプトン (Difco社製)、0.5%塩化ナトリウム、0.2%グルコース、0.5%リン酸水素二ナトリウム) を用いて3時間から一晩培養した遠心分離 (5,000rpm, 15分間) 上清を検体とする。また、コレラ菌 *Vibrio cholerae* の場合、患者材料より分離された菌株を、2%Casamino acid (Difco社製)、0.6% yeast

extract(Difco社製), 0.25 %塩化ナトリウム, 0.871 %リン酸水素二カリウム, 0.25%グルコース, 5 %塩化マグネシウム, 0.5 %塩化マンガン, 0.5 %塩化第三鉄, 0.001 %硫酸を用いて3時間から一晩培養した遠心分離(5,000rpm, 15分間)上清を検体とする。

【0031】病原因子を捕捉した高分子材料は、次に病原因子に対するポリクローナル抗体を500 ~2000倍希釈した、0.9%塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液またはリン酸緩衝液に作用させる。この時の反応条件は室温~37℃で10~90分間が好ましい。また、病原因子に対する抗体に直接標識酵素を結合させたものを用いてもよい。反応後は材料を0.05%ポリエチレンソルビタンモノラウレート, 0.9 %塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液またはリン酸緩衝液にて2~6回洗浄する。

【0032】次に高分子材料を、病原因子に対するポリクローナル抗体を得た同じ動物種のイムノグロブリンに対する抗体と標識酵素が結合した酵素標識抗体を500 ~2000倍希釈した0.05%ポリエチレンソルビタンモノラウレート, 0.9 %塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液またはリン酸緩衝液に反応させる。この時の反応条件は室温~37℃で10~90分間が好ましい。反応後は材料を0.05%ポリエチレンソルビタンモノラウレート, 0.9 %塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液またはリン酸緩衝液にて2~6回洗浄する。

【0033】上記のように反応させて得られた高分子材料は、酵素反応後に不溶性生成物を生ずる酵素基質溶液に反応させるが、水溶液に対する溶解度の低い基質を用いる場合はジメチルスルホキシド(DMSO), ジメチルホルムアミド(DMF), メタノール, エタノールなどの有機溶媒に予め溶解した後に水溶液に混合したものを用いる。

【0034】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

#### 実施例1

(財)化学及び血清療法研究所より購入したコレラエンテロトキシン(CT)の検出を以下の様に行った。

【0035】CTに対するポリクローナル抗体は以下の方法により得た。すなわち、精製CTを25 $\mu$ g/mlになる様に0.9 %塩化ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0 : 以下PBS と略す)に溶解し、これに等量の Freund completeアジュバント(Difco 社製)を加えたものを用いて体重約2kgのウサギを免疫し、25日後再びCTに等量の Freund incomplete アジュバント(Difco 社製)を加えたものを用いて免疫し、抗血清を得た。これに50%の硫酸アンモニウムを加えて沈殿を生じさせるが、これを2回繰り返し得られた沈殿を10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解し、同緩衝液で透析した後、得られた免疫グロブリンをポリクローナル抗体として用いた。

【0036】CTに対するモノクローナル抗体は以下の方法により得た。すなわち、PBSにて25 $\mu$ g/mlに溶解したCT0.5mlを等量の Freund complete アジュバントと共に用いて6~8週齢BALB/c マウスを免疫し、21日後更に等量の Freund incomplete アジュバントを加えたCTを用いて免疫し、32日目にマウスの脾細胞を得た。得られた脾細胞はSP2/o ミエローマ細胞とそれぞれ約 $1 \times 10^6$ 個ずつポリエチレングリコール(PEG1500, Boehringer Mannheim 社製)にて融合させ、2.5 %ウシ血清,  $1 \times 10^{-6}$ Mヒポキサンチン,  $4 \times 10^{-6}$ M アミノプテリン,  $1.6 \times 10^{-5}$ M チミジンを含む Celgrosser-B 培地(住友製薬社製)でハイブリドーマを選択した。得られたハイブリドーマはBALB/c マウス腹腔に $2 \times 10^6$ 個注入し7~14日で腹水が著明になった時点で腹水を回収し、2,500rpm, 10分間遠心分離して得た上清をモノクローナル抗体として用いた。

【0037】エチレン酢酸ビニル共重合体(EVA 三井・デュポンポリケミカル社製)からなる縦1cm, 横1cm, 厚さ0.5mmのシートを15%水酸化ナトリウムの80%メタノール溶液中で50℃, 2時間浸漬し蒸留水にて洗浄後2%アミノアセタールの0.5N塩酸溶液中で58℃, 5時間浸漬した。洗浄、乾燥後、1%(w/v)無水マレイン酸-メチルビニルエーテル共重合体(Gantrez AN-169)の脱水アセトン溶液中に常温で2.5時間浸漬し、アセトンにて洗浄後、真空乾燥したシートを固定化に用いた。固定化はこのシートをCTに対するマウス腹水より得られたモノクローナル抗体を含む緩衝液中に浸漬することにより行った。

【0038】このようにして得られた抗体固定化EVAシートは1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含む0.9%塩化ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.2, 以下PBSと略す)に浸漬することによりブロッキングを行った後、500ng/ml CTを含むPBSに1.5時間浸漬した。毒素の検出に際しては、0.05%ポリエチレンソルビタンモノラウレートを含むPBSにて洗浄後、PBSにて500倍希釈したCTに対するウサギポリクローナル抗体を常温で1.5時間反応させ、再び洗浄後西洋ワサibel オキシダーゼ標識抗マウスIgG(Cappel社製)を500倍希釈した0.05%ポリエチレンソルビタンモノラウレートを含むPBSにて常温で1.5時間反応させ、洗浄後0.5mg/ml 4-クロロ-1-ナフトール, 0.5 $\mu$ l/ml 過酸化水素水, 17%メタノールを含む20mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.2)中で37℃, 30分間反応させることにより行った。

【0039】このように反応させた抗体固定化EVAシートは濃青色に発色した。一方、CTの含まれていない溶液に浸漬した以外は先の操作と全く同じ操作を行った抗体固定化EVAシートでは発色は認められなかった。

#### 【0040】実施例2

ナイロン6(ユニチカ(株)製)からなる縦1cm, 横1cm,

厚さ0.2cmのシートを3N塩酸中に30℃、30分間浸漬した後、蒸留水にて洗浄した。乾燥後10% (w/v)のポリエチレンジアミン水溶液とメタノールとの1:5混合液に室温で30分間浸漬した後、2倍量の5%ジシクロヘキシルカルボジイミドのメタノール溶液を加え、引き続き室温で2時間浸漬した。メタノールにて洗浄、乾燥後、2% (w/v) 無水マレイン酸-メチルビニルエーテル共重合体の脱水アセトン溶液中に室温で1時間浸漬し、アセトンにて洗浄後真空乾燥したシートを固定化に用いた。固定化はこのシートをCTに対するマウス腹水より得られたモノクローナル抗体を含む緩衝液中に浸漬することにより行った。

【0041】このようにして得られた抗体固定化ナイロンシートは1%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.9%塩化ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.2)に浸漬することによりブロッキングを行った後、500ng/ml CTを含むPBSに1.5時間浸漬した。毒素の検出に際しては、0.05%ポリエチレンソルビタンモノラウレートを含むPBSにて洗浄後、PBSで500倍希釈したCTに対するウサギポリクローナル抗体を常温で1.5時間反応させ、再び洗浄後アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG(Cappel社製)を500倍希釈した0.05%ポリエチレンソルビタンモノラウレートを含むPBSにて常温で1.5時間反応させ、洗浄後0.25mM ニトロブルーテトラゾリウム、0.25mM 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸を含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)に37℃、15分間浸漬することにより行った。

【0042】このように反応させた抗体固定化ナイロンシートは濃青色に発色した。一方、CTの含まれていない溶液に浸漬した以外は先の操作と全く同じ操作を行った抗体固定化ナイロンシートでは発色は認められなかった。

#### 【0043】実施例3

実施例2と同じナイロンシートを3N塩酸中に30℃、30分間浸漬した後、蒸留水にて洗浄した。乾燥後2% (w/v) スチレン-無水マレイン酸共重合体の脱水アセトン溶液中に室温で1時間浸漬し、アセトンにて洗浄後真空乾燥したシートを固定化に用いた。固定化は実施例2同様、シートをCTに対するマウス腹水より得られたモノクローナル抗体を含む緩衝液中に浸漬することにより行ったが、この方法ではポリエチレンジアミン、ジシクロヘキシルカルボジイミド等の処理を省くことができた。

【0044】このようにして得られた抗体固定化ナイロンシートを用いて実施例2と同じ方法により500ng/mlのCTの検出を行った。

【0045】実施例2の手順にて反応させた抗体固定化ナイロンシートは無水マレイン酸-メチルビニルエーテルで処理したシートと同様、濃青色に発色した。一方、CTの含まれていない溶液に浸漬した以外は先の操作と全く同じ操作を行った抗体固定化ナイロンシートでは発

色は認められなかった。

#### 【0046】実施例4

腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒(TDH)の検出を以下の通りに行った。

【0047】腸炎ビブリオのTDHは、次の方法で得た。すなわち *Vibrio parahaemolyticus* T-4750 (大阪大学 微生物病研究所 保有菌)をペプトン食塩培地(1%ペプトン(Difco社製)、3%塩化ナトリウム)で37℃、20時間振盪培養した後、10,000rpm、20分間の遠心分離により培養上清を得た。上清に56g/100mlの硫酸アンモニウムを加え生じた沈殿を10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.2)に溶解し、同緩衝液で透析した後、2gの臭化シアン活性化Sephrose 4B(Pharmacia社製)に精製した抗TDHイムノグロブリン10mgを結合させて得られたイムノアフィニティカラムにかけ、0.5M塩化ナトリウムを含む0.2Mグリシン-塩酸緩衝液(pH2.7)で溶出させることによりTDHの精製を行った。

【0048】TDHに対するポリクローナル抗体は以下の方法により得た。すなわち、精製した100μg/mlのTDHを0.5ml等量のFreund complete アジュバント(Difco社製)と共に用いて体重約2kgのウサギを免疫し、25日後、再び精製したTDHに等量のFreund incomplete アジュバント(Difco社製)を用いて免疫し、抗血清を得た。これに50%の硫酸アンモニウムを加え沈殿を生じさせるが、この操作を2回繰り返し、得られた沈殿を10mMリン酸緩衝液(pH7.2)に溶解し、同緩衝液で透析し、免疫グロブリンを得た。得られた免疫グロブリンをポリクローナル抗体として用いた。

【0049】TDHに対するモノクローナル抗体は以下の方法により得た。すなわち、精製した15μg/0.25ml TDHのPBS溶液に等量のFreund complete アジュバントを加えたものを用いて、6~8週齢のBALB/cマウスを免疫し、4週間後、更に20μg/0.25mlのTDHを等量のFreund incomplete アジュバントと共に用いて免疫した。免疫したマウスの脾細胞を取り出し、この細胞 $1 \times 10^8$ 個と等量のX6-Ag8.653ミエローマ細胞とをポリエチレングリコール(PEG1500, Boehringer Mannheim社製)を用いて融合させ、2.5%ウシ血清、 $1 \times 10^{-4}$ Mヒポキサンチン、 $4 \times 10^{-7}$ Mアミノプテリン、 $1.6 \times 10^{-5}$ Mチミジンを含むCelgrosser-H培地(住友製薬社製)にてハイブリドーマを選択した。得られたハイブリドーマはBALB/cマウス腹腔に $2 \times 10^6$ 個注入し7~14日で腹水が著明になった時点で腹水を回収し2,500rpm、10分間遠心分離して得た上清をモノクローナル抗体として用いた。

【0050】実施例2と同じ方法で、TDHに対するマウス腹水より得られたモノクローナル抗体を固定化したナイロンシートを用いて500ng/mlのTDHの検出を行った。

【0051】このように反応させた抗体固定化ナイロン



シートは濃青色に発色した。一方、TDHの含まれていない溶液に浸漬した以外は先の操作と全く同じ操作を行った抗体固定化ナイロンシートでは発色は認められなかった。

#### 【0052】実施例5

実施例4の腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒(TDH)の代りにTDH類似毒素(TRH)に対するマウス腹水より得られたモノクローナル抗体を用いた他は、実施例2と同様に抗体固定化ナイロンシートを得た。

【0053】このようにして得られた抗体固定化ナイロンシートを用いて実施例2と同じ方法により500ng/mlのTRHの検出を行った。このように反応させた抗体固定化ナイロンシートは濃青色に発色した。一方、TRHの含まれていない溶液に浸漬した以外は先の操作と全く同じ操作を行った抗体固定化ナイロンシートでは発色は認められなかった。

#### 【0054】実施例6

毒素原性大腸菌の定着因子CFA/IIIの検出による毒素原性大腸菌検出を以下の様に行った。

【0055】毒素原性大腸菌の定着因子CFA/IIIは次の方法で得た。すなわち、Escherichia coli 260-1 (大阪大学 微生物病研究所 保有菌)をCFA寒天培地(1% Casamino Acids (Difco 社製), 0.15%酵母抽出物(Difco 社製), 0.005%硫酸マグネシウム, 0.0005%塩化マンガン, 2%寒天)で37℃, 20時間培養した後、遠心分離により菌体を回収し、1mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.4)に懸濁し、ホモジナイザー(Ultra Turrax, Janke & Kunkel KG社製)にて冷却しながら3分間ホモジネートした。得られたホモジネートを15.000×g, 20分間, 4℃で遠心分離することにより上清を得て、更に50,000×g, 60分間遠心分離したものを粗液として得た。得られた粗液を、1mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.8)で平衡化させたSepharose4B (2.2×75cm: Pharmacia社製)カラムにかけた後、4Mの濃度になるように塩化ナトリウムを加え、次にフェニル-Sepharose CL-4B (Pharmacia 社製)を4M 塩化ナトリウム含有2mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.8)で平衡化させたカラムにかけ、4.0~0Mまでの塩化ナトリウムの直線濃度勾配を含む2mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.8)で溶出させることにより、CFA/IIIの精製を行った。

【0056】CFA/IIIに対するポリクローナル抗体は以下の方法により得た。すなわち、CFA寒天培地で37℃, 20時間培養したE. coli 260-1を0.5%ホルマリンを含むPBS (0.9%塩化ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.2))にて懸濁し、これをウサギに1日目に0.5ml, 5日目に1.0ml, 10日目に1.5ml, 15日目に2.0ml, 20日目に2.0ml, 25日目に2.0ml注射することによりウサギを免疫し、30日目に抗血清を得た。これに50%の硫酸アンモニウムを加え沈殿を生じさせる操作を

2回繰り返して、得られた沈殿をPBSに溶解し、同緩衝液で透析し、免疫グロブリンを得た。得られた免疫グロブリンをポリクローナル抗体として用いた。

【0057】CFA/IIIに対するモノクローナル抗体は以下の方法により得た。すなわち、精製した20μg/0.4mlのCFA/III PBS溶液を等量のFreund completeアジュバンド(Difco 社製)と共に用いてBALB/cマウスを免疫し、4週間後、さらに20μg/0.3mlのCFA/IIIを等量のFreund incomplete アジュバンド(Difco 社製)と共に用いて免疫した。免疫したマウスの脾細胞を取り出し、この細胞と等量のX6-Ag8.653ミエローマ細胞とをポリエチレングリコール(PEG1500, BoehringerMannheim社製)を用いて融合させ、2.5%ウシ血清, 1×10<sup>-4</sup>M ヒポキサンチン, 4×10<sup>-7</sup>M アミノプテリン, 1.6×10<sup>-6</sup>M チミジンを含むCellgroser-H培地(住友製薬社製)にてハイブリドーマを選択した。得られたハイブリドーマをBALB/cマウス腹腔に2×10個注入し、7~14日で腹水が著明になった時点で腹水を回収し、2,500rpm, 10分間遠心分離した。得られた上清をモノクローナル抗体として用いた。

【0058】実施例3と同じ方法にて、CFA/IIIに対するマウス腹水より得られたモノクローナル抗体を固定化したナイロンシートを用いて500ng/mlのCFA/IIIの検出を行った。このように反応させた抗体固定化ナイロンシートは濃青色に発色した。一方、CFA/IIIの含まれていない溶液に浸漬した以外は先の操作と全く同じ操作を行った抗体固定化ナイロンシートでは発色は認められなかった。

#### 【0059】実施例7

毒素原性大腸菌の易熱性エンテロトキシン(LT)に対するモノクローナル抗体を実施例3と同じ方法により固定化したナイロンシートを用いて500ng/mlのLTの検出を行った。なお、毒素はSIGMA社より購入したものを用い、モノクローナル抗体、ウサギポリクローナル抗体は実施例1のCTと同様の方法により得た。また、毒素の検出方法は実施例2に従った。

【0060】本法によりLTを検出した抗体固定化ナイロンシートは濃青色に発色した。一方、LTの含まれていない溶液に浸漬した以外は先の操作と全く同じ操作を行った抗体固定化ナイロンシートでは発色は認められなかった。

#### 【0061】実施例8

ボツリヌス菌(Clostridium botulinum)のボツリヌス毒素C型に対するモノクローナル抗体を実施例3と同じ方法により固定化したナイロンシートを用いて500ng/mlのボツリヌス毒素C型の検出を行った。なお、毒素はSIGMA社より購入したものを用い、モノクローナル抗体、ウサギポリクローナル抗体は実施例1のCTと同様の方法により得た。また、毒素の検出方法は実施例2に従った。

【0062】本法によりボツリヌス毒素C型を検出した抗体固定化ナイロンシートは濃青色に発色した。一方、ボツリヌス毒素C型の含まれていない溶液に浸漬した以外は先の操作と全く同じ操作を行った抗体固定化ナイロンシートでは発色は認められなかった。

#### 【0063】実施例9

ウエルシュ菌のホスホリパーゼC ( $\alpha$ -毒素) の検出を以下の様に行った。

【0064】ウエルシュ菌のホスホリパーゼC ( $\alpha$ -毒素) は次に示す Yamakawa らの報告(J. Biochem., Vol. 81, p. 115-126, 1977) した方法に従い得た。すなわち、*Clostridium perfringens* PB6K-N5を 8.5% Todd-Hewitt Broth (Difco社), 0.45 %  $K_2HPO_4$ , 0.63% 塩化ナトリウム, 0.38% グルコース, 0.013% システイン-塩酸塩からなる培地で37℃, 静置培養し、遠心分離にて培養上清を得た。上清を限外濾過にて10倍に濃縮し、酢酸カルシウムを最終濃度0.1Mになるように、水酸化ナトリウムを pH7.0になるように加え、遠心分離し、得られた上清を50% 硫酸塩析した。得られた沈殿を 0.15M 塩化ナトリウムを含む50mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5) に溶解し、5% エタノールを含む50mM 酢酸緩衝液(pH5.0) に対し透析した後、酢酸緩衝液で平衡化した CM-Sephadex カラムクロマトグラフィーにかけた。0.05, 0.1, 1.0M 塩化ナトリウムを含む緩衝液にて溶出し、活性のある0.1Mの溶出画分をアンモニアにてpHを7.0 ~ 7.5 に保ちながら60% 硫酸塩析を行った。得られた沈殿を50mM 塩化ナトリウム, 5% エタノールを含む50mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5) に溶解し、同緩衝液に対して透析を行い、同緩衝液で平衡化した DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィーにかけた。これを 0.125, 0.1, 0.05M 塩化ナトリウムを含む50mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5) で溶出し、0.125Mの活性画分を Amicon UM-2で濃縮した後、60% 硫酸塩析を行った。得られた沈殿を0.15M 塩化ナトリウムを含む50mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5) に溶解し、Sephadex G-100カラムクロマトグラフィーにかけ、溶出画分に対し60% 硫酸塩析を行い、得られたものをホスホリパーゼC ( $\alpha$ -毒素) として用いた。

【0065】ホスホリパーゼC ( $\alpha$ -毒素) に対するモノクローナル抗体とウサギポリクローナル抗体は実施例1のCTと同様の方法により得た。

【0066】CTと同様、実施例2に従い、先に作製したモノクローナル抗体を固定化したナイロンシートを用い、精製したホスホリパーゼC ( $\alpha$ -毒素) の検出を行った。

【0067】本法によりホスホリパーゼC ( $\alpha$ -毒素) を検出した抗体固定化ナイロンシートは濃青色に発色した。一方、ホスホリパーゼC ( $\alpha$ -毒素) の含まれていない溶液に浸漬した以外は先の操作と全く同じ操作を行った抗体固定化ナイロンシートでは発色は認められなかった。

#### 【0068】実施例10

ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*) のエンテロトキシンに対するモノクローナル抗体を実施例3と同じ方法により固定化したナイロンシートを用いて 500ng/ml のエンテロトキシンの検出を行った。なお、エンテロトキシンは SIGMA社から購入したエンテロトキシンBを用い、モノクローナル抗体、ウサギポリクローナル抗体は実施例1のCTと同様の方法により得た。また、毒素の検出は実施例2に従い行った。

【0069】本法によりブドウ球菌のエンテロトキシンを検出した抗体固定化ナイロンシートは濃青色に発色した。一方、エンテロトキシンの含まれていない溶液に浸漬した以外は先の操作と全く同じ操作を行った抗体固定化ナイロンシートでは発色は認められなかった。

#### 【0070】実施例11

ジフテリア菌(*Corynebacterium diphtheriae*) のジフテリア毒素に対するモノクローナル抗体を実施例3と同じ方法により固定化したナイロンシートを用いて500ng/ml のジフテリア毒素の検出を行った。なお、ジフテリア毒素は SIGMA社から購入したものをを用い、モノクローナル抗体、ウサギポリクローナル抗体は実施例1のCTと同様の方法により得た。また、毒素の検出は実施例2に従い行った。

【0071】本法によりジフテリア毒素を検出した抗体固定化ナイロンシートは濃青色に発色した。一方、ジフテリア毒素の含まれていない溶液に浸漬した以外は先の操作と全く同じ操作を行った抗体固定化ナイロンシートでは発色は認められなかった。

#### 【0072】実施例12

百日咳菌(*Bordetella pertussis*)の百日咳毒素に対するモノクローナル抗体を実施例3と同じ方法により固定化したナイロンシートを用いて500ng/mlの百日咳毒素の検出を行った。なお、百日咳毒素は SIGMA社から購入したものをを用い、モノクローナル抗体、ウサギポリクローナル抗体は実施例1のCTと同様の方法により得た。また、毒素の検出は実施例2に従い行った。

【0073】本法により百日咳毒素を検出した抗体固定化ナイロンシートは濃青色に発色した。一方、百日咳毒素の含まれていない溶液に浸漬した以外は先の操作と全く同じ操作を行った抗体固定化ナイロンシートでは発色は認められなかった。

#### 【0074】実施例13

赤痢菌の志賀毒素の検出を以下の様に行った。

【0075】赤痢菌の志賀毒素は次に示す Osnes らの報告(J. Biol. Chem., Vol. 255, p. 284-289, 1980)した方法に従い得た。すなわち、*Shigella dysenteriae* 1 MK102株を0.05  $\mu$ g/mlのFeを加え、リン酸カルシウム量を抑えた N-Z Amine A培地(Sheffield Chemical 社)で37℃, 24時間培養した後、遠心分離により培養上清を得、50mM 塩化ナトリウムを含む 5 mM リン酸緩衝液(pH7.4) に

対して透析を行った。次に、10%酢酸処理したカニ甲キチン(SIGMA社製) かなるカラムを0.14M 塩化ナトリウム含有5mMリン酸緩衝液(pH7.4) で平衡化し、これに培養上清を透析したものを作用させて毒素を吸着させ、1M 塩化ナトリウムで溶出させた。さらに、塩化ナトリウム濃度勾配のDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーおよびシュクロース濃度勾配のDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにかけることにより精製を行った。

【0076】志賀毒素に対するモノクローナル抗体とウサギポリクローナル抗体は実施例1のCTと同様の方法により得た。

【0077】CTと同様、実施例2に従い、先に作製したモノクローナル抗体を固定化したナイロンシートを用い、精製した志賀毒素の検出を行った。

【0078】本法により志賀毒素を検出した抗体固定化ナイロンシートは濃青色に発色した。一方、志賀毒素の含まれていない溶液に浸漬した以外は先の操作と全く同じ操作を行った抗体固定化ナイロンシートでは発色は認められなかった。

【0079】実施例14

緑膿菌のエクソトキシンAの検出を以下の様に行った。

【0080】緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* のエクソトキシンAは LIST BIOLOGICAL LABORATORIES, INC. から購入したものを用いた。

【0081】エクソトキシンAに対するモノクローナル抗体とウサギポリクローナル抗体は実施例1のCTと同様の方法により得た。

【0082】CTと同様、実施例2に従い、先に作製したモノクローナル抗体を固定化したナイロンシートを用い、精製したエクソトキシンAの検出を行った。

【0083】本法によりエクソトキシンAを検出した抗体固定化ナイロンシートは濃青色に発色した。一方、エクソトキシンAの含まれていない溶液に浸漬した以外は先の操作と全く同じ操作を行った抗体固定化ナイロンシートでは発色は認められなかった。

【0084】実施例15

ディフィシル菌のトキシンAの検出を以下の様に行った。

【0085】ディフィシル菌のトキシンAは次に示す中村信一の報告(医学細菌学Vol.5, p.55-97, 1990)した方法に従い得た。すなわち、*Clostridium difficile* VP110463をBH11培地(Difco社製)の透析培養法にて培養した。得られた培養上清は、ウシサイログロブリン溶液とアフィゲル15(バイオラッド社)を反応させて得ら

れるカラムにかけ、まず、4℃、0.15M 塩化ナトリウムを含む50mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.0)で溶出し、次に同緩衝液にて37℃で溶出した。37℃で溶出した活性画分をファルマシア社 FPLC のQ-セファロースカラムにかけ、0~1M の塩化ナトリウム濃度勾配により溶出させた。活性画分を回収し、0.15M 塩化ナトリウムを含む50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.0) に対して透析した後、Mono-Qカラムにかけ0~1M の塩化ナトリウム濃度勾配により溶出した。こうして得られた試料をトキシンAとして用いた。

【0086】トキシンAに対するモノクローナル抗体とウサギポリクローナル抗体は実施例1のCTと同様の方法により得た。

【0087】CTと同様、実施例2に従い、先に作製したモノクローナル抗体を固定化したナイロンシートを用い、精製したトキシンAの検出を行った。

【0088】本法によりトキシンAを検出した抗体固定化ナイロンシートは濃青色に発色した。一方、トキシンAの含まれていない溶液に浸漬した以外は先の操作と全く同じ操作を行った抗体固定化ナイロンシートでは発色は認められなかった。

【0089】実施例16

破傷風菌 *Clostridium tetani* の破傷風毒素の検出を以下の様に行った。

【0090】破傷風菌の破傷風毒素は LIST BIOLOGICAL LABORATORIES, INC. から購入したC-フラグメントを用いた。

【0091】破傷風毒素C-フラグメントに対するモノクローナル抗体とウサギポリクローナル抗体は実施例1のCTと同様の方法により得た。

【0092】CTと同様、実施例2に従い、先に作製したモノクローナル抗体を固定化したナイロンシートを用い、精製した破傷風毒素C-フラグメントの検出を行った。

【0093】本法により破傷風毒素C-フラグメントを検出した抗体固定化ナイロンシートは濃青色に発色した。一方、破傷風毒素C-フラグメントの含まれていない溶液に浸漬した以外は先の操作と全く同じ操作を行った抗体固定化ナイロンシートでは発色は認められなかった。

【0094】

【発明の効果】本発明によれば、感染症の原因とされる病原因子に対する抗体を固定化した高分子材料を用ることにより、特別な分析装置を必要とせず、検体中の病原因子を極めて迅速・簡便に検出することが可能である。